

· 基础研究 ·

全身热疗对大鼠海马神经元凋亡蛋白表达的影响

王端玉 赵鑫 卜祥梅 王志刚

【摘要】目的 观察用丙泊酚和水合氯醛全身麻醉建立全身高温模型的大鼠海马神经元凋亡蛋白的表达,探讨全身热疗诱导大鼠海马神经元凋亡的信号途径。**方法** 63 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为空白对照组(A组)、丙泊酚麻醉热疗组(B组)、水合氯醛麻醉热疗组(C组),每组 21 只。B、C 两组热疗后 24 h, A、B、C 3 组大鼠同时断头取脑,采用 TUNEL 法检测海马神经元凋亡百分比,免疫组化法检测 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白的表达,透射电镜观察神经元超微结构的变化。**结果** B、C 两组与 A 组比较,大鼠海马神经元超微结构发生改变,B 组神经元超微结构损害较 C 组轻;B 组和 C 组的海马神经元凋亡百分比和 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达均高于 A 组($P < 0.05$),C 组 Bax、caspase-3 阳性评分高于 B 组($P < 0.05$)、Bcl-2 阳性评分低于 B 组($P < 0.05$)。**结论** 全身热疗通过上调 Bax、caspase-3 表达和下调 Bcl-2 表达诱导大鼠海马神经元凋亡。

【关键词】 热疗; 凋亡; Bax; Bcl-2; Caspase-3

Whole body hyperthermia and the expression of neuron apoptotic proteins WANG Duan-yu*, ZHAO Xin, BU Xiang-mei, WANG Zhi-gang. *Shandong University School of Medicine, Jinan 250012, China
Corresponding author: WANG Zhi-gang, Email: carefree007@sohu.com

【Abstract】Objective To observe the expression of neuron apoptotic protein caused by whole body hyperthermia (WBH) in rats anesthetized using propofol and chloral hydrate, and to explore the pathway of any hippocampal neuron apoptosis induced by WBH. **Methods** Sixty-three male Wistar rats were randomly divided into 3 groups, 21 in each group. One group received neither anesthesia nor WBH treatment as a control (group A); group B were anesthetized with an intraperitoneal injection of 100 mg/kg of propofol; group C received a similar injection of chloral hydrate. This was followed by WBH (keeping the rats' core temperature at 42° for 30 min) for all three groups. The rats' brains were then removed 24 h after WBH to separate the hippocampal CA1, CA2 zones and the dentate gyrus regions. Any neuron apoptosis was detected using the TUNEL method; Bax/Bcl-2/caspase-3 protein expression was measured with a SABC immunohistochemical technique; and the changes in ultrastructure were observed with an electron microscope. **Results** Compared with group A, the changes in the ultrastructure of neurons in the hippocampus changed after WBH were the most severe in group C. The changes included edema of the organelles, vacuolization of mitochondria, rarefaction of the endocytosplasmic reticulum, incomplete synaptic membranes and autophagy. Both the number of apoptotic neurons and the expression of Bax and capase-3 protein in the hippocampus increased in the following order: group A < group B < group C. Expression of Bcl-2 protein in the hippocampus increased in the following order: group A < group C < group B. **Conclusion** Hippocampal apoptosis induced by WBH involves upregulating the expression of Bax and caspase-3 and downregulating the expression of Bcl-2.

【Key words】 Hyperthermia; Apoptosis; Bax; Bcl-2; Caspase-3

全身热疗(whole body hyperthermia, WBH)是一种治疗肿瘤的新方法,可增强细胞凋亡调节基因的表达而导致肿瘤细胞凋亡,对于已有远处转移或将要出现转移的晚期肿瘤病例是一种有效的治疗途径。全身热

疗在诱导肿瘤细胞凋亡的同时也可损伤机体正常的细胞,造成多器官尤其是脑功能的损害,临床上常见患者在全身热疗后出现疲劳、恶心、呕吐以及认知功能障碍等并发症,这可能与高温引起的大脑损伤有关,然而全身热疗引起脑损伤的信号机制尚不清楚。异丙酚是一种对脑缺血再灌注损伤具有保护作用的全身麻醉药^[1],可以拮抗神经元凋亡,本研究拟通过观察用异丙酚和水合氯醛全身麻醉建立全身高温模型大鼠的海马神经元凋亡蛋白 Bax、Bcl-2、caspase-3 的表达,来探讨全身热疗诱导大鼠海马神经元凋亡的信号途径。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.03.004

基金项目:山东省科学技术发展计划项目资助课题(2007GG20002014)

作者单位:250012 济南,山东大学医学院(王端玉、卜祥梅);山东大学第二医院麻醉科(赵鑫),麻醉镇痛科(王志刚)

通信作者:王志刚, Email: carefree007@sohu.com

材料与方法

一、实验动物及相关药品和仪器

健康雄性 Wistar 大鼠 63 只(清洁级, 3~4 月龄, 体重 300~350 g, 山东大学实验动物中心提供); 异丙酚(四川蜀乐药业有限公司, 20 ml, 批号: 0703201); 10% 水合氯醛(山东齐鲁制药厂); 兔抗鼠 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 单克隆抗体(一抗)羊抗兔(二抗)、链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)和 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程公司); HKN-93A 型婴儿辐射保温台(宁波戴维医疗器械有限公司); 电子显微镜(H-800 型日立公司)。

二、动物分组及全身热疗模型制作

63 只大鼠随机分为 3 组($n=21$): 空白对照组(A 组)、异丙酚麻醉热疗组(B 组)、水合氯醛麻醉热疗组(C 组)。A 组普通实验室喂养, 不进行特殊处理; B 组和 C 组大鼠分别采用异丙酚 100 mg/kg 体重和 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 体重腹腔注射麻醉后, 模拟临床晚期肿瘤患者远红外辐射舱 WBH 治疗, 采用红外线辐射型加温装置(450 W, 50 Hz)距离大鼠 40 cm 全身均匀照射建立 WBH 模型, 将电子测温仪探头插入直肠 3~4 cm 监测直肠温度, 使大鼠直肠温度升至 42℃ 并保持 30 min。WBH 过程中用微量泵以 $16 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度腹腔注射平衡盐液。

三、海马神经元凋亡和 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达的检测

大鼠 WBH 后 24 h 水合氯醛麻醉开胸, 经心尖将灌注针插入主动脉, 在右心耳边缘剪一小切口作为灌注液的出口, 依次用生理盐水 250 ml、4℃ 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 250 ml 灌注固定。断头取脑, 在视交叉海马齿状回平面连续冠状冰冻切片。采用原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导 dUTP 标记(TUNEL)法检测神经元凋亡情况。按试剂盒说明书操作, DAB 显色, 光镜下观察, 细胞核中出现棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞, 即凋亡细胞。高倍镜下($\times 400$)分别连续数 100 个海马 CA1、CA2 区和齿状回神经元, 计数 TUNEL 阳性细胞, 求阳性细胞百分比。免疫组化法检测 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达, 按试剂盒说明书操作, DAB 显色, 显微镜高倍视野连续计数 200 个神经元, 其中细胞核内和细胞浆内均可见棕褐色颗粒者为强阳性细胞, 计 3 分; 细胞浆内可见棕黄色颗粒为阳性细胞, 计 2 分; 细胞浆内可见淡黄色颗粒为弱阳性细胞, 计 1 分, 阳性评分 = 强阳性细胞个数 $\times 3$ + 中阳性细胞个数 $\times 2$ + 弱阳性细胞个数 $\times 1$ 。

四、大鼠海马神经元超微结构的观察

各组随机选择 3 只大鼠, WBH 后 24 h 腹腔注射

10% 水合氯醛麻醉快速处死动物, 取海马 CA1 区小块脑组织, 快速用 PBS 冲洗组织周围的血液等污物并即刻放入 3% 戊二醛固定液; 2~3 min 后修整样品为 1 mm^3 , 放入新鲜的 3% 戊二醛固定液; 之后按常规透射电镜(transmission electron microscope, TEM)样品制备方法漂洗、 OsO_4 固定、漂洗、脱水、浸透、Epon812 包埋; 光镜半薄切片定位后行超薄切片; 经柠檬酸铅和醋酸铀电子染色后, H-800 电镜观察。

五、统计学处理

采用随机分组设计, 应用 SPSS 10.0 统计软件分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

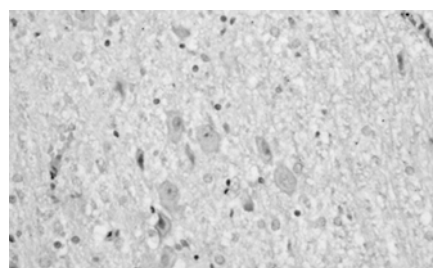
一、神经元凋亡及凋亡蛋白表达

A 组海马仅见个别神经元凋亡; 与 A 组比较, B 组和 C 组凋亡神经元百分比均增高($P < 0.05$), 出现较多的免疫阳性细胞, 有凋亡小体形成, 见图 1; C 组神经元凋亡百分比比较 B 组高($P < 0.05$)。A 组极少见 Bax、Bcl-2、caspase-3 阳性神经元; 与 A 组相比, B 组和 C 组 Bax、Bcl-2、caspase-3 阳性评分均增加($P < 0.05$), C 组 Bax、caspase-3 阳性评分高于 B 组($P < 0.05$)、Bcl-2 阳性评分低于 B 组($P < 0.05$), 见表 1 和图 1。

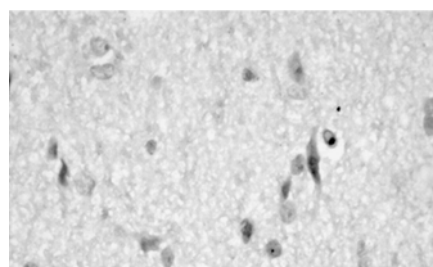
表 1 3 组海马神经元凋亡百分比及 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经元凋亡 (%)	Bax 阳性评分(分)	Bcl-2 阳性评分(分)	caspase-3 阳性评分(分)
A 组	21	1.1 ± 0.6	2.2 ± 1.0	2.4 ± 0.9	2.8 ± 1.7
B 组	21	7.7 ± 3.3^{ab}	41.2 ± 14.5^{ab}	54.5 ± 13.3^{ab}	30.1 ± 10.3^{ab}
C 组	21	13.7 ± 2.5^a	55.9 ± 12.2^a	35.2 ± 12.0^a	42.2 ± 12.4^a

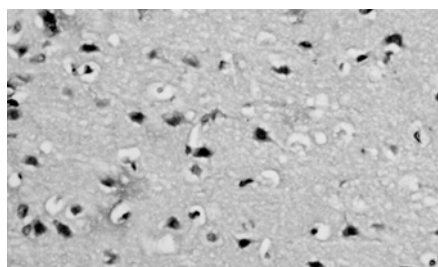
注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^b $P < 0.05$



A 组



B 组



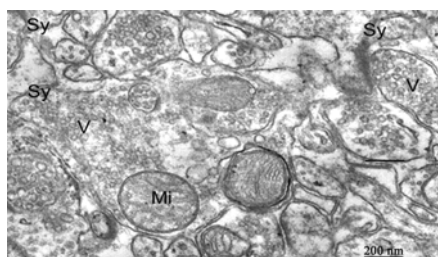
C 组

注:A 组神经元形态正常,仅出现个别凋亡细胞;B 组可见少量免疫阳性凋亡细胞,视野中央右侧可见凋亡小体形成;C 组出现较多免疫阳性凋亡细胞,呈棕黄或棕褐色染色,凋亡神经元体积小,外形不规则,核染色质浓缩、边聚,附着于核膜内表面成新月形或环状,有大量凋亡小体形成

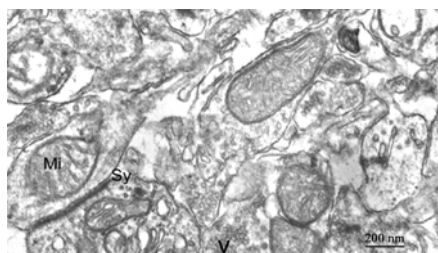
图 1 3 组大鼠海马神经元凋亡情况(TUNEL 染色, $\times 400$)

二、神经元超微结构改变

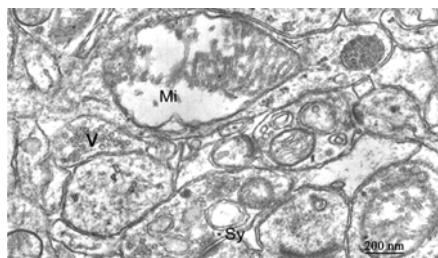
3 组大鼠海马 CA1 区神经元超微结构形态见图 2。A 组大鼠海马神经元细胞多为圆形,核圆,核仁居中,各种细胞器丰富;线粒体、内质网、高尔基复合体正常;突触数量较多,突触小泡清晰,突触前膜和突触后膜结构完整。B、C 两组大鼠海马神经元细胞体积较对照组明显增大,形状不规则,多为长梭形,核椭圆,核仁大,各种细胞器肿胀变形;部分线粒体嵴缺失或空化,高尔基复合体肿胀模糊,内质网稀疏,多见自噬体结



A 组



B 组



C 组

注:Mi 为线粒体;Sy 为突触;V 为突触小泡

图 2 3 组大鼠海马神经元超微结构改变

构;突触数量少,突触小泡清晰,大部分突触前膜和突触后膜结构不完整,神经终末部分线粒体空化。与 B 组相比,C 组大鼠海马神经元超微结构损害较重,详见图 2。

讨 论

全身热疗可通过诱导肿瘤细胞凋亡、激发机体免疫防御系统活性^[2]而发挥抑制肿瘤和转移瘤的血管形成及肿瘤转移、增强化疗等疗效。动物实验和临床实践已证实机体对 WBH 的最大耐受温度为 $41.8 \sim 42.0^\circ\text{C}$ ^[3]。有报道指出 42.0°C 高温作用于细胞 30 min 后即可观察到细胞骨架改变^[4],因而本实验模拟临床晚期肿瘤患者远红外辐射舱 WBH 治疗,采用红外线辐射型加温装置照射,建立大鼠全身热疗模型。

高温可引起全身血管扩张,平均动脉压降低,脑组织灌注降低,加之高温使组织代谢加快、耗氧剧增,导致脑组织缺血缺氧的发生^[5],由此致使 DNA 损伤、蛋白氧化和脂质过氧化的氧化物生成增加,导致细胞损伤和死亡^[6]。细胞凋亡是受各种基因调控的程序化死亡过程,其途径分为凋亡受体介导的胞外途径和胞内线粒体途径,这两个途径并不是孤立存在的,具有交互作用并在激活 caspase 水平汇聚,而 caspase-3 在细胞的凋亡中起着最后枢纽的作用^[7]。

异丙酚具有酚羟基结构,有抗氧化作用,能直接清除活性氧自由基、抑制脂质过氧化反应,拮抗神经元的过氧化损伤^[8];还可以减少缺血部位兴奋性氨基酸的释放^[9];另外异丙酚还可通过调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达来调节凋亡^[10],亦可减轻 TNF 介导的细胞凋亡^[11]。异丙酚 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射对大鼠缺血再灌注的神经细胞具有一定的保护作用^[1],且多数实验研究采用此种剂量和给药途径^[12],因此本实验用异丙酚和水合氯醛作为诱导全高温时的全身麻醉药,比较两组大鼠高温后海马神经元凋亡蛋白表达的差别。

实验中 B、C 两组大鼠海马神经元 Bax 和 caspase-3 蛋白的表达显著高于 A 组,细胞凋亡程度也明显比 A 组严重;B 组 Bax 和 caspase-3 蛋白的表达弱于 C 组,前者的细胞凋亡百分比和神经元超微结构损害也小于后者,这可能与异丙酚减少 Bax 和 caspase-3 蛋白的表达拮抗细胞凋亡有关^[13],提示 Bax 参与了高温诱导的大鼠海马神经元凋亡过程。Bax 主要存在于胞浆中,其激活伴随着 Bax 的构象改变、Bax 的线粒体易位和细胞色素 c 的释放,使线粒体膜电位降低而产生功能障碍,诱导线粒体内膜间隙蛋白释放,激活下游效应酶 caspase-3^[6]。同时,缺血缺氧/再灌注也可增强

caspase-3 的酶活性^[14],使 caspase-3 被大量激活,从而启动细胞凋亡的 caspase 相关级联反应。缺血缺氧/再灌注时细胞能产生大量的活性氧自由基,而活性氧自由基在细胞功能紊乱的诱发和扩增中起重要的作用,是激活 caspase-8 介导的细胞凋亡过程的关键因素,而激活了的 caspase-8 可诱导 Bax 嵌入线粒体膜并释放细胞色素 c 等蛋白,最终激活 caspase-3 引起细胞凋亡^[6]。

Bcl-2 主要位于线粒体,是一种可以对抗细胞凋亡发生的凋亡调控癌基因^[11],其拮抗细胞凋亡的作用与 Bax 促凋亡作用相对。本实验中 B 组大鼠海马神经元 Bcl-2 蛋白的表达显著高于 C 组,神经元超微结构损害也较轻,原因可能是在此过程中异丙酚增强了 Bcl-2 蛋白的表达,提示全身高温时 Bax 蛋白的表达参与了诱发大鼠海马神经元凋亡的过程,而 Bcl-2 则发挥抑制细胞凋亡的作用。

综上所述,全身热疗可通过上调 Bax 和 caspase-3 蛋白表达同时下调 Bcl-2 蛋白的表达,来诱导大鼠海马神经元的凋亡;异丙酚可拮抗热疗引起的神经细胞凋亡,因而可为全身热疗更广泛地应用于肿瘤及其他疾病的临床治疗提供有效的脑保护作用。

参 考 文 献

- [1] 杨宾侠,王永利,赵靓丽. 异丙酚对大鼠局灶性脑缺血/再灌注后细胞凋亡的影响. 中华麻醉学杂志,2003,23: 288-290.
- [2] 陈雪琴,马胜林. 肿瘤热疗作用机制研究进展. 中华物理医学与康复杂志,2005,27: 562-564.
- [3] 陈杰,陶惠民. 全身热疗在肿瘤治疗中的应用机制. 国外医学骨科学分册,2003,24: 157-159.
- [4] 刘宇炜,余达经. 高温对细胞骨架的影响. 中华物理医学与康

杂志,2006,28: 495-497.

- [5] Nunneley SA, Martin CC. Changes in regional cerebral metabolism during systemic hyperthermia in humans. J Appl Physiol, 2002, 92: 846-851.
- [6] Kim BM, Chung HW. Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS-mediated caspase-8/Bid/Bax pathway in human lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363: 745-750.
- [7] Park HJ, Kim YJ, Leem K, et al. Coptis japonica root extract induces apoptosis through caspase-3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells. Phytother Res, 2005, 19: 189-192.
- [8] Osakada F, Hashino A, Kume T, et al. Alpha-tocotrienol provides the most potent neuroprotection among vitamin E analogs on cultured striatal neurons. Neuropharmacology, 2004, 47: 904-915.
- [9] 杨静,李天左,张炳熙,等. 异丙酚对谷氨酸诱导大鼠海马神经元损伤的影响. 中华麻醉学杂志,2005,25: 917-918.
- [10] Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, et al. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. Anesthesiology, 2004, 101: 912-917.
- [11] Luo T, Xia Z, Ansley DM, et al. Propofol dose-dependently reduces tumor necrosis factor-alpha-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis; effects on Bcl-2 and Bax expression and nitric oxide generation. Anesth Analg, 2005, 100: 1653-1659.
- [12] 孟凡军,李燕,李刚,等. 丙泊酚对大鼠空间学习、记忆及脑内 nNOS 表达的影响. 基础医学与临床,2005,25: 1062-1066.
- [13] 冯春生,麻海春,岳云,等. 异丙酚对大鼠局灶性脑缺血再灌注时 NF- κ B 活化和 Bcl-2, Caspase-3 基因表达的影响. 中华麻醉学杂志,2006,26: 456-459.
- [14] Choi JY, Kim BM, Kim YJ, et al. Hypoxia/reoxygenation-induced cytotoxicity in cultured human lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352: 366-371.

(收稿日期:2008-06-20)

(本文编辑:阮仕衡)

· 消息 ·

上海国际骨科康复学术会议暨第一届现代关节外科康复学讲习班会议通知

由上海交通大学医学院附属第九人民医院、上海交通大学 Med-X 研究院共同主办,上海交通大学康复医学工程研究所、上海市康复医学工程研究会共同承办,上海市残疾人联合会、香港“站起来计划”、上海市康复医学会共同指导与支持的上海国际骨科康复学术会议暨第一届现代关节外科康复学讲习班将于 2009 年 5 月 28 日至 31 日在上海交通大学浩然高科技大厦会展中心召开。参会者将授予国家级继续教育 I 类学分 8 分。

本次会议邀请来自海内外著名骨科及康复专家何兆邦(美)、陈启明(港)、冯贵游(港)、柴惠敏(台)、戴尅戎、励建安、李建军、黄东锋、严隽陶等,围绕震后康复、现代骨科康复学新进展两大主题,着重对震后康复、骨科康复治疗技术新进展、康复医学工程的前沿进展、关节稳定性训练与关节松动术、关节外科康复、脊柱外科康复 6 个专题展开深入讨论。会议后半程将同步举行“骨科转化性研究与前沿技术国际研讨会”,会议议题中骨软骨代谢的力学调节、老年骨骼健康、运动医学中的软组织问题、脊柱退变性疾病的生物学治疗等与骨科康复学息息相关。大会诚挚邀请国内外康复、骨科及工程技术人员与会。

报到时间:2009 年 5 月 28 日上午;报到地点:上海交通大学浩然高科技大厦会展中心;会议注册:500 元/人,若同期参加骨科转化性研究与前沿技术国际研讨会 800 元/人;联系方式:上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科(上海制造局路 639 号,邮编:200011);联系电话/传真:(021)63139920;Email: 91guke@163.com;联系人:水汶、殷宁